

(43) 国際公開日
2001年3月8日 (08.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/16337 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/60, 9/88, G06F 17/30

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/05901

(22) 国際出願日: 2000年8月30日 (30.08.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平11/246797 1999年8月31日 (31.08.1999) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 鐘淵化学工業株式会社 (KANEKA CORPORATION) [JP/JP];
〒530-0005 大阪府大阪市北区中之島三丁目2番4号
Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 中井孝尚 (NAKAI, Takahisa) [JP/JP]; 〒655-0853 兵庫県神戸市垂水区つつじが丘四丁目8番1号 名谷つつじが丘ビレジ1号棟
1201号室 Hyogo (JP). 守川壮一 (MORIKAWA, Souichi)[JP/JP]; 〒670-0001 兵庫県姫路市河間町46-5 明治グラ
ンドビル302号室 Hyogo (JP). 石井清人 (ISHII, Kiyoto)
[JP/JP]; 〒673-0869 兵庫県明石市大蔵谷東山478番地
の6302号室 Hyogo (JP). 難波弘憲 (NANBA, Hirokazu)
[JP/JP]; 〒676-0025 兵庫県高砂市西畑一丁目16番20
Hyogo (JP). 矢島麗嘉 (YAJIMA, Kazuyoshi) [JP/JP]; 〒
673-0005 兵庫県明石市小久保120番地の55 A804号室
Hyogo (JP). 池中原裕 (IKENAKA, Yasuhiro) [JP/JP]; 〒
651-2242 兵庫県神戸市西区井吹台東町五丁目21番3号
Hyogo (JP). 高橋里美 (TAKAHASHI, Satomi) [JP/JP];
〒655-0851 兵庫県神戸市垂水区神和台一丁目13番13
号 Hyogo (JP).(74) 代理人: 山本秀策 (YAMAMOTO, Shusaku); 〒540-
6015 大阪府大阪市中央区城見一丁目2番27号 クリス
タルタワー15階 Osaka (JP).

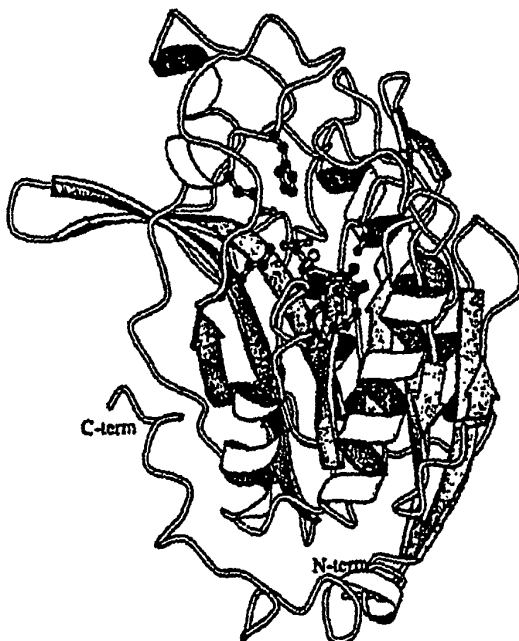
(81) 指定国 (国内): CN, IN, KR, SG, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).添付公開書類:
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: STEREOSTRUCTURE OF DECARBAMYLASE AND METHOD OF USING THE SAME

(54) 発明の名称: デカルバミラーゼの立体構造およびその利用法



(57) Abstract: Excellent decarbamylase variants which are more advantageously usable industrially are provided by clarifying the stereostructure of decarbamylase by X-ray crystalline structure analysis and designing molecules aiming at elevating the reactivity to the substrates (D-N-carbamoyl- α -amino acids), etc. by using the stereostructure. More particularly speaking, provision is made of: the stereostructure of decarbamylase determined by X-ray crystalline structure analysis, stereostructure models of variants thereof and stereostructure models of complexes thereof with substrates, products, etc.; a molecular design method with the use of these stereostructures; a method of obtaining decarbamylase variants by using this method; the decarbamylase variants obtained by this method; and a method of designing and producing variants of proteins which are similar to decarbamylase in structure.

[続葉有]

WO 01/16337 A1

ATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

To:

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)
02 May 2001 (02.05.01)

International application No.
PCT/JP00/05901

Applicant's or agent's file reference
KA022PCT

International filing date (day/month/year)
30 August 2000 (30.08.00)

Priority date (day/month/year)
31 August 1999 (31.08.99)

Applicant

NAKAI, Takahisa et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
26 March 2001 (26.03.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

R. Forax

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

47
Translation
10/070.480

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

| | | |
|--|--|---|
| Applicant's or agent's file reference KA022PCT | FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) | |
| International application No. PCT/JP00/05901 | International filing date (day/month/year) 30 August 2000 (30.08.00) | Priority date (day/month/year) 31 August 1999 (31.08.99) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/60, 9/88, G06F 17/30 | | |
| Applicant KANEKA CORPORATION | | |

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 9 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☒ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

| | |
|--|---|
| Date of submission of the demand 26 March 2001 (26.03.01) | Date of completion of this report 28 September 2001 (28.09.2001) |
| Name and mailing address of the IPEA/JP | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone No. |

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/05901

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/05901

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 35

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 35
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

See supplemental sheet for continuation of Box III. 1.

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported
by the description that no meaningful opinion could be formed.

☒ no international search report has been established for said claims Nos. 35

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.

☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III. 1.

The invention set forth in Claim 35 relates to a storage medium storing data describing three dimensional structures of decarbamylase variants, and is a mere presentation of information. It thus relates to subject matter which does not require international preliminary examination by this International Preliminary Examining Authority, under the provisions of PCT Article 34(2)(a)(i) and PCT Rule 67.1(iv).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/05901

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☒ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with.
- ☒ not complied with for the following reasons:

See supplemental sheet for continuation of Box IV. 1.

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☐ all parts.
- ☒ the parts relating to claims Nos. 1-34

Supplemental Box~~(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)~~

Continuation of: IV. 3.

The common feature of Claims 1-34 is "crystalline decarbamylase".

Such "crystalline decarbamylase" was known before the filing date of the present invention, being disclosed in the document Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr., Vol. 55 (Part 3) (March 1999), pp. 694-695; therefore, said common feature does not make a contribution to the prior art and does not constitute a special technical feature as stipulated in PCT Rule 13.2.

Therefore, the inventions set forth in Claims 1-34 do not constitute a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept, but comprise six groups of inventions, in Claims 1-7, 8-13, 14, 15, 16-20 and 21-34.

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability;
~~citations and explanations supporting such statement~~

1. Statement

| | | | |
|-------------------------------|--------|--------------------------------|-----|
| Novelty (N) | Claims | 1-13, 22-30, 32-34 | YES |
| | Claims | 14-21, 31 | NO |
| Inventive step (IS) | Claims | 8-13, 22, 24, 26-30, 32 | YES |
| | Claims | 1-7, 14-21, 23, 25, 31, 33, 34 | NO |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-34 | YES |
| | Claims | | NO |

2. Citations and explanations

Document 1: W. H. Hsu et al., "Expression, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of N-carbamyl-D-amino-acid aminohydrolase from *Agrobacterium radiobacter*", Acta Crystallogr., D Biol. Crystallogr. (March 1999), Vol. 55 [Part 3], pp. 694-695

Document 2: EP, 677584, A1

Document 3: EP, 780473, A2

Document 4: A. Buson et al., "Identification, sequencing and mutagenesis of the gene for a D-carboamoylase from *Agrobacterium radiobacter*", FEMS Microbiol. Lett. (1996), Vol. 145, No. 1, pp. 55-62

Document 5: WO, 94/03613, A1

Document 6: N. Declerck et al, "Hyperthermostable mutants of *Bacillus licheniformis* α -amylase: multiple amino acid replacement and molecular modelling", Protein Eng. (1995), Vol. 8, No. 10, pp. 1029-1037

Document 7: C. O. Pabo, "Computer-aided design of thermostable proteins", AD Rep. (1989), [AD-A-210 096]

Claims 14-21

Documents 1 and 5 disclose decarbamylase from a species of Agrobacterium. The inventions set forth in Claims 14-21 are characterized by specified three-dimensional structural topology and the three-dimensional structure of the active site, but these features are also structures inherent to the decarbamylase disclosed in Documents 1 and 5. Therefore, the decarbamylases in themselves are indistinguishable.

Claim 31

Documents 2-5 disclose decarbamylase variants with improved heat resistance (Document 2 in particular discloses variants in which Pro²⁰³, exactly the same site as in the variant designed in Example 7 in the present application, is replaced by leucine, serine, asparagine, glutamic acid, alanine, isoleucine, histidine or threonine (Claim 18, etc.)).

At first sight, the inventions disclosed in Documents 2-5 appear to differ from the decarbamylase described in Claim 31 in that none of them are obtained by a design procedure described in any of Claims 25 to 30; however, it is obvious that the products of such design are the same and are indistinguishable as variants of decarbamylase.

Claims 1-7

Document 5 discloses Agrobacterium decarbamylase having the amino acid sequence presented in SEQ ID NO:2 and the amino acid sequence presented in SEQ ID NO:1 cited in Claim 1 in the present application.

Document 5 differs from the invention set forth in Claim 1 in that it does not mention crystallization of said enzyme.

However, Document 1 discloses crystallization of ~~Agrobacterium decarbamylase, and the fact that the~~ crystals belong to space group P2₁ and that the crystals include a heavy metal.

Therefore, it would not be difficult for a person skilled in the art, given the disclosure in Document 1, to attempt crystallization of the invention in Document 5, to investigate use of a heavy metal atom and to attempt to freeze the resulting crystals using a known technique.

Claims 23, 25, 33 and 34

Documents 6 and 7 disclose methods for producing protein variants with enhanced functional properties starting from the three-dimensional structure of said protein, as well as systems and programs for this purpose.

Documents 6 and 7 do not mention the application thereof to decarbamylase; however, Document 1 analyses the three-dimensional structure of decarbamylase, and states that the object is to obtain heat-stable decarbamylase.

Therefore, a person skilled in the art could easily conceive of selecting decarbamylase as the object of a design method for variants disclosed in Document 6 or 7.

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

| | | |
|----------------------------|---|-------------------------|
| 出願人又は代理人 の書類記号 KA022PCT | 今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。 | |
| 国際出願番号 PCT/JPO0/05901 | 国際出願日 (日.月.年) 30.08.00 | 優先日 (日.月.年) 31.08.99 |
| 出願人(氏名又は名称) 鐘淵化学工業株式会社 | | |

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☒ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☒ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 2 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☒ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 35 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲35に係る発明はデカルバミラーゼ変異体の立体構造を記述したデータが記録された記録媒体に係るものであって、情報の単なる提示に該当するから、特許協力条約第17条(2)(a)(i)及び特許協力条約に基づく規則39.1(v)の規定によりこの国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

特許請求の範囲第1-34項に共通の事項は「デカルバミラーゼ結晶」である。
ここで、「デカルバミラーゼ結晶」は文献Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., Vol. 55[Part3] (1999) p. 694-695に記載されるように本出願前公知であると認められるから、当該共通事項は先行技術の域を出るものではなく、PCT規則13.2における特別な技術的事項であるとはいえない。
したがって、請求の範囲第1-34項に記載された発明は単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいえず、請求の範囲1-7, 8-13, 14, 15, 16-20, 21-34からなる6つの発明群からなるものであると認められる。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N15/60, C12N9/88, G06F17/30

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N15/60, C12N9/88, G06F17/30

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル(JOIS), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG),
MEDLINE (STN),
EMBL/DDBJ/Genbank/PIR/Swissprot/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|---------------------|
| PX | Structure Fold. Des., Vol. 8[7] (2000-Jul) T. Nakai et al. "Crystal structure of N-carbamyl-D-amino acid amidohydrolase with a novel catalytic framework common to amidohydrolases" p. 2991-3006 | 1-21, 31 |
| X Y | Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., Vol. 55[Part3] (1999-Mar) W. H. Hsu et al. "Expression, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of N-carbamyl-D-amino-acid amidohydrolase from <i>Agrobacterium radiobacter</i> " p. 694-695 | 14-21 1-7, 22-34 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.11.00

国際調査報告の発送日

12.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇

4B

9453

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|-----------------------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| X Y | WO, 94/03613, A1 (鐘淵化学工業株式会社) 17. 2月. 1994 (17. 02. 94) 請求項37 (配列番号1及び配列番号29) 参照 &EP, 610517, A1 &JP, 6-505186, A &CN, 1083528, A &US, 5824522, A &US, 6083752, A | 14-21, 31 1-7, 22-30, 32-34 |
| X | EP, 677584, A1 (Eniricerche S.P.A.) 18. 10月. 1995 (18. 10. 95) 特許請求の範囲参照 &JP, 8-84584, A &DE, 69500108, B &ES, 2096494, B &US, 5807710, A &US, 5869298, A &IT, 1269321, B | 31 |
| X | EP, 780473, A2 (Eniricerche S.P.A.) 25. 6月. 1997 (25. 06. 97) 特許請求の範囲参照 &JP, 9-173068, A &US, 5877003, A &US, 5877002, A &IT, 1277125, B &KR, 97042446, A | 31 |
| X | FEMS Microbiol. Lett., Vol.145[1] (1996) A. Buson et al. "Identification, sequenceing and mutagenesis of the gene for a D-carboamoylase from <i>Agrobacterium radiobacter</i> " p. 55-62 | 31 |
| Y | Protein Eng., Vol.8[10] (1995) N. Declerck et al. "Hyperthermostable mutants of <i>Bacillus licheniformis</i> α - amilase: multiple amino acid replacements and molecular modelling" p.1029-1037 | 22-34 |
| Y | AD Rep., [AD-A-210 096] (1989) C. O. Pabo "Computer-Aided Design of Thermostable Proteins" | 22-34 |

PCT

REC'D 12 OCT 2001

WIPO PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕

| | | |
|--|---|-------------------------|
| 出願人又は代理人 書類記号 KA022PCT | 今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。 | |
| 国際出願番号 PCT/JP00/05901 | 国際出願日 (日.月.年) 30.08.00 | 優先日 (日.月.年) 31.08.99 |
| 国際特許分類(IPC) Int.Cl ¹ C12N15/60, C12N9/88, G06F17/30 | | |
| 出願人(氏名又は名称) 鐘淵化学工業株式会社 | | |

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 6 ページからなる。
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。

- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
 - ☒ 国際予備審査報告の基礎
 - ☐ 優先権
 - ☒ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
 - ☒ 発明の単一性の欠如
 - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - ☐ ある種の引用文献
 - ☐ 国際出願の不備
 - ☐ 国際出願に対する意見

| | | |
|---|----------------------------|---------|
| 国際予備審査の請求書を受理した日 26.03.01 | 国際予備審査報告を作成した日 28.09.01 | |
| 名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官(権限のある職員) 上 條 肇 | 4B 9453 |
| 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 | | |

様式PCT/IPEA/409(表紙)(1998年7月)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

Ⅲ. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不成

1. 次に関して、当該請求の範囲に記載されている発明の新規性、進歩性又は産業上の利用可能性につき、次の理由により審査しない。

☐ 国際出願全体

☒ 請求の範囲
 35

理由：

☒ この国際出願又は請求の範囲 35 は、国際予備審査をすることを要しない
次の事項を内容としている（具体的に記載すること）。

請求の範囲 3 5 に係る発明はデカルバミラーゼ変異体の立体構造を記述したデータが記録された記録媒体に係るものであって、情報の単なる提示に該当するから、特許協力条約第 3 4 条 (2) (a) (i) 及び特許協力条約に基づく規則 6 7. 1 (v) の規定によりこの国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。

☐ 明細書、請求の範囲若しくは図面（次に示す部分）又は請求の範囲 _____ の記載が、不明確であるため、見解を示すことができない（具体的に記載すること）。

☐ 全部の請求の範囲又は請求の範囲 _____ が、明細書による十分な裏付けを欠くため、見解を示すことができない。

☒ 請求の範囲 35 について、国際調査報告が作成されていない。

2. ヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が実施細則の附属書C（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン）に定める基準を満たしていないので、有効な国際予備審査をすることができない。

☐ 書面による配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

☐ フレキシブルディスクによる配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

IV. 発明の単一性の欠如

1. 請求の範囲の減縮又は追加手数料の納付の求めに対して、出願人は、

- ☐ 請求の範囲を減縮した。
- ☒ 追加手数料を納付した。
- ☐ 追加手数料の納付と共に異議を申立てた。
- ☐ 請求の範囲の減縮も、追加手数料の納付もしなかった。

2. ☐ 国際予備審査機関は、次の理由により発明の単一性の要件を満たしていないと判断したが、PCT規則68.1の規定に従い、請求の範囲の減縮及び追加手数料の納付を出願人に求めないこととした。

3. 国際予備審査機関は、PCT規則13.1、13.2及び13.3に規定する発明の単一性を次のように判断する。

- ☐ 満足する。
- ☒ 以下の理由により満足しない。

特許請求の範囲第1-34項に共通の事項は「デカルバミラーゼ結晶」である。

ここで、「デカルバミラーゼ結晶」は文献Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., Vol. 55[Part3](1999-Mar)p. 694-695に記載されるように本出願前公知であると認められるから、当該共通事項は先行技術の域を出るものではなく、PCT規則13.2における特別な技術的事項であるとはいえない。

したがって、請求の範囲第1-34項に記載された発明は単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいえず、請求の範囲1-7, 8-13, 14, 15, 16-20, 21-34からなる6つの発明群からなるものであると認められる。

4. したがって、この国際予備審査報告書を作成するに際して、国際出願の次の部分を、国際予備審査の対象にした。

- ☐ すべての部分
- ☒ 請求の範囲 1-34 に関する部分

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

| | | | |
|----------------|-------|--------------------------------|---|
| 新規性 (N) | 請求の範囲 | 1-13, 22-30, 32-34 | 有 |
| | 請求の範囲 | 14-21, 31 | 無 |
| 進歩性 (IS) | 請求の範囲 | 8-13, 22, 24, 26-30, 32 | 有 |
| | 請求の範囲 | 1-7, 14-21, 23, 25, 31, 33, 34 | 無 |
| 産業上の利用可能性 (IA) | 請求の範囲 | 1-34 | 有 |
| | 請求の範囲 | | 無 |

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

- 文献1 W.H.HSU et al., Expression, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of N-carbamyl-D-amino-acid amidohydrolase from *Agrobacterium radiobacter* Acta Crystallogr., D Biol. Crystallogr. (1999-Mar), Vol. 55[Part3], p. 694-695
- 文献2 EP 677584 A1
- 文献3 EP 780473 A2
- 文献4 A.BUSON et al., Identification, sequenceing and mutagenesis of the gene for a D-carboamoylase from *Agrobacterium radiobacter*, FEMS Microbiol. Lett. (1996), Vol. 145, No. 1, p. 55-62
- 文献5 WO 94/03613 A1
- 文献6 N.DECLERCK et al., Hyperthermostable mutants of *Bacillus licheniformis* α -amilase: multiple amino acid replacements and molecular modelling, Protein Eng. (1995), Vol. 8, No. 10, p. 1029-1037
- 文献7 C.O.PABO, Computer-Aided Design of Thermostable Proteins, AD Rep. (1989), [AD-A-210 096]

請求の範囲14~21

文献1, 5には*Agrobacterium*属由来のデカルバミラーゼが記載されている。請求項範囲14~21に記載された発明は特定の立体構造トポロジー、活性部位の立体構造により特徴付けられるとされるものであるが、これらの特徴は文献1, 5記載のデカルバミラーゼが元々有する構造であるといえる。したがって、両者はデカルバミラーゼとしては何ら区別することができない。

請求の範囲31

文献2~5にはデカルバミラーゼの耐熱性を向上させた変異体が記載されている(特に文献2においては本願実施例7で設計されている変異体と全く同じである変異部位プロリン203のロイシン、セリンアスパラギン、グルタミン酸、アラニン、イソロイシン、ヒスチジン、またはスレオニンへの変異体が開示されている(請求項18その他))。

文献2~5に記載の発明は、請求の範囲31に係るデカルバミラーゼは請求項25~30のいずれか1項に記載の設計方法によって得られたものでない点で、一見異なるものの、その設計の結果同じ物が得られることは明白であり、デカルバミラーゼ変異体として両者を区別することができない。

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V 欄の続き

請求の範囲 1～7

文献5には本願請求項1の配列番号1に示されるアミノ酸配列及び配列番号2に示されるアミノ酸配列を有するAgrobacterium属由来のデカルバミラーゼが開示されている。

文献5には当該酵素を結晶化することが記載されていない点で請求の範囲1に係る発明と相違する。

しかしながら、文献1にはAgrobacterium属由来のデカルバミラーゼを結晶化すること、結晶は空間群P2₁に属すること、結晶中に重金属を含ませることについても記載されている。

したがって、文献5に記載された発明を文献1の記載を基に結晶化しようとするのと並びに重金属原子を用いようとする、また生成させた結晶を周知技術を用いて凍結しようとするもののいずれも当業者ならば格別に困難なことであったとはいえない。

請求の範囲 23, 25, 33, 34

文献6, 7には蛋白質の立体構造に基づいて当該蛋白質の機能の向上した変異体を作成する方法及びそのシステム、プログラムが開示されている。

文献6, 7にはデカルバミラーゼを対象とすることが記載されていないが、文献1にはデカルバミラーゼの立体構造を解くこと、そして目的は温度安定性を有するデカルバミラーゼを得ることが記載されている。

よって、文献6, 7に開示された変異体設計方法の対象としてデカルバミラーゼを選択しようすることは当業者であれば容易に想到しうる程度のことに過ぎない。